

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-322762

(43)Date of publication of application : 16.12.1997

(51)Int.Cl.	C12N	1/20
	A23C	9/12
	A23G	3/00
	A23G	9/02
	A23K	1/16
	A23L	2/52
	/(C12N	1/20
	C12R	1:01)

(21)Application number : 08-268593 (71)Applicant : FOOD IND RES & DEV INST

(22)Date of filing : 09.10.1996 (72)Inventor : YANG YUANN-SHIUANN
CHEN MEI-CHING
LIAO CHII-CHERNG

(30)Priority

Priority number : 96 85106752 Priority date : 05.06.1996 Priority country : TW

(54) BIFIDOBACTERIUM AND ITS CULTURE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain new bifidobacterium variants highly resistant to bile salt, gastric acid and oxygen, by mutation of a highly viable and gastric acid-resistant bifidobacterium strain having tolerance to gastric juice and obtained from infant feces.

SOLUTION: The new bifidobacterium variants are as follows: acid-resistant *Bifidobacterium longum* Y1 and Y2 (ATCC 55813 and 5814) which are obtained from healthy infant feces; mutant ATCC 55815 and 55816 which are obtained by e.g. UV irradiation of the Y1 strain, and mutant ATCC 55817 and 55818 each derived from the Y2 strain. These mutants have tolerance to bile salt or acid-contg. gastrointestinal environment, also being highly resistant to oxygen; therefore enabling their culture process to be simplified and being advantageous for their industrial culture. These new bifidobacterium variants are useful as starters, food additives, digestive antifatulents, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.10.1996

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3017687

[Date of registration] 24.12.1999

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-322762

(43) 公開日 平成9年(1997)12月16日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 1/20			C12N 1/20	A
A23C 9/12			A23C 9/12	
A23G 3/00	101		A23G 3/00	101
9/02			9/02	
A23K 1/16	304		A23K 1/16	304 B

審査請求 有 請求項の数11 O L (全13頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-268593

(22) 出願日 平成8年(1996)10月9日

(31) 優先権主張番号 85106752

(32) 優先日 1996年6月5日

(33) 優先権主張国 台湾 (T W)

(71) 出願人 596032694

財団法人食品工業発展研究所
台湾新竹市食品路331号

(72) 発明者 楊 媛綯

台湾新竹市食品路331号

(72) 発明者 陳 美菁

台湾新竹市食品路331号

(72) 発明者 廖 啓成

台湾新竹市食品路331号

(74) 代理人 弁理士 服部 雅紀

(54) 【発明の名称】 ビフィズス菌及びその培養方法

(57) 【要約】

【課題】 酸および酸素に対する耐性をもつビフィズス菌株及びその発酵培養方法を提供する。

【解決手段】 本発明の菌株は、健康な嬰兒の便から分離した耐酸性ビフィズス菌株 1 Bif-idobacterium longum Y 1 及び Y 2 (ATCC 55813 及び 55814) 及び胆汁塩、酸及び酸素に対する耐性を有し、当該菌株を原始菌株として突然変異を経て得られた菌株 1 B. longum ATCC 55815、55816、55817、55818 であり、これらは脱脂乳中で好氣的条件下においてその他成長促進剤を加えずに培養しても、良好に成長させることができ、産業上生産するのに適している。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 受託番号がATCC 55813であるビフィズス菌菌株1 ビフィドバクテリウムロンガム(*Bifidobacterium longum*) Y1。

【請求項2】 受託番号がATCC 55814であるビフィズス菌菌株1 ビフィドバクテリウムロンガム(*Bifidobacterium longum*) Y2。

【請求項3】 受託番号がATCC 55815であるビフィズス菌菌株1 ビフィドバクテリウムロンガム(*Bifidobacterium longum*) Y1-2E-05。

【請求項4】 受託番号がATCC 55816であるビフィズス菌菌株1 ビフィドバクテリウムロンガム(*Bifidobacterium longum*) Y1-4A-01。

【請求項5】 受託番号がATCC 55817であるビフィズス菌菌株1 ビフィドバクテリウムロンガム(*Bifidobacterium longum*) Y2-1A-01。

【請求項6】 受託番号がATCC 55818であるビフィズス菌菌株1 ビフィドバクテリウムロンガム(*Bifidobacterium longum*) Y2-2B-04。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかに記載の菌株の一つを、脱脂乳において、25～45℃、酸素の存在する条件下で培養することを特徴とする菌株の培養方法。

【請求項8】 請求項1～6のいずれかに記載の菌株の一つを直接食品原料に添加して製造することを特徴とする食品組成物。

【請求項9】 牛乳、濃縮牛乳、粉ミルク、アイスクリーム、ヨーグルト、チーズ、リンゴジュース、豆乳、ケーキ、キャンディー、ベビーフード、食事療法製品、液体ヨーグルト、発酵乳、冷凍ヨーグルト、乳酸菌発酵飲料及び発酵豆乳のうち、いずれか1つを食品原料として製造したことを特徴とする、請求項8記載の食品組成物。

【請求項10】 請求項1～6のいずれかに記載の菌株の1つを食品を発酵させるスターターとして選ぶことを特徴とする食品の発酵方法。

【請求項11】 液体ヨーグルト、発酵乳、冷凍ヨーグ

ルト、乳酸発酵飲料及び発酵豆乳のうちのいずれか1つを食品製品とすることを特徴とする請求項10記載の食品の発酵方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は胆汁塩、胃酸および酸素に対する耐性を同時に持つビフィズス菌と、並びに酸素の存在する条件下において当該菌株を培養する方法とに関するものである。

【0002】

【従来の技術】ビフィズス菌は乳児の健常腸内菌の指標とされている。ビフィズス菌は年齢層により菌群の種類分布や数量が異なるが、ビフィズス菌は年齢が上がるほど減少する傾向にあり、臨床試験では健康との関連性が示されている。腐敗菌や病原菌を抑制し、腸内正常菌のバランスを維持し、毒性アミンの生成を抑制し、ビタミンB群を合成し、嬰兒の利用に有利なL型乳酸を生成するなどの生理活性を有する。

【0003】しかし、ビフィズス菌はその他の乳酸菌に比べて嫌酸素性があり、このため菌体の培養及び製品の包装において菌の活力を維持することが難しく、コストが増え、菌製品の応用において問題となっている。その他、菌体が摂取された後、人体胃腸環境に耐えて腸で吸着されるという特性があるため、有効菌株の選択は菌株の胃酸、胆汁塩に対する耐性並びに分離源と地域性などに関連性がある。このため酸素、酸及び胆汁塩に対する耐性をもつ菌株の選択はビフィズス菌の開発において大きな目標となっている。現在までに世界各地で百種類近い関連製品が開発されているが、上記の条件に完全に符合する菌株はまだない。すでに発表されたビフィズス菌耐性菌株及び製造工程特許及び文献は日本が最も多く

(表1～6を参照)、酸、酸素耐性菌株が主流で、胆汁塩耐性菌株は少ない。

【0004】

【表1】

すでに特許を受けている菌株の特徴(1)

菌株	発明者	分離源	特徴	申請者	参考文献
<i>B. bifidum</i> YIT-4002 (FERM-P 3371)	務台方彦 など (Mutai et al)	母乳で 育てら れた健 康嬰兒 の便	1. 成長促進剤を 添加しなくと も、6.5ppm酸 素下において 5.0×10^9 cfu /ml、0.1ppm 酸素下におい て 6.5×10^9 c fu/ml にまで 成長する (24 時間)。	ヤクル ト	UPS 4087559 (1978)
<i>B. bifidum</i> YIT-4005 (FERM-P 3372)	務台方彦 など	母乳で 育てら れた健 康嬰兒 の便	1. 酸素耐性で、 24時間の成長 は嫌気成長と 同じく 10^9 cfu /ml に達する。 2. 耐酸性で、pH 4.2で7日間 保存した結果 生残率は4%。 (牛乳や緩衝液 でも同じ)	ヤクル ト	UPS 4091117 (1978) 特公昭 56-42250 (1981)
<i>B. breve</i> YIT-4006 (FERM-P 3906)	務台方彦 など	母乳で 育てら れた健 康嬰兒 の便	1. 成長促進剤を 添加しなくと も、24時間で 10^9 cfu/ml に 達する。	ヤクル ト	UPS 4187321 (1980) 特公昭 59-53031 (1984)

すでに特許を受けている菌株の特徴(2)

菌株	発明者	分離源	特徴	申請者	参考文献
<i>B. breve</i> HW-107 (FERM 5774)	石川英之 など	健常な 乳幼児 の便	1. 耐酸性 (胃酸) pH3.5、37℃ /1hrで菌数は log 値が3.89 減少。 (緩衝液)	ミドリ 十字株 式会社	特開昭 57-99190 (1982)
<i>B. longum</i> M-8201 (FERM 6548)	川島拓司 など	健常な 乳幼児 の便	1. 耐酸性 pH4.6 で7日 間保存した結 果、生残率は 11.8% (緩衝 液)。 pH4.8 で7日 間保存した結 果、生残率は 53.6% (牛乳)。	森永乳 業	特公昭 59-53829 (1984)
<i>B. breve</i> SBR 3212 (FERM 11915)	吉野泰 など	母乳で 育てた 月齢数 ヵ月の 健常な 嬰兒の 便。	1. 耐酸性 pH4.0 で7日 間保存した結 果、生残率は 牛乳中で8%、 緩衝液で23%。 2. 酸素耐性 24時間培養後 10倍に増殖し、 48時間後も5 倍を維持。	雪印乳 業	特開平 4-320642 (1992)

すでに特許を受けている菌株の特徴(3)

菌株	発明者	分離源	特徴	申請者	参考文献
<i>B. infantis</i> CNCM 1-372 <i>B. bifidum</i> CNCM 1-373 <i>B. breve</i> CNCM 1-374	Sozzi	—	1. 耐酸性 1-372, 1-373, 1-374 を pH4. 0 で 7 日間保 存した結果、 生残率はそれ ぞれ 100%、75 %、70%。40 日保存は 70%、 60%、14%。 (牛乳中) 2. 酸素耐性 成長促進剤の 添加が必要。	ネッス ル	USP 4870020 (1989) 特開昭 61-205481 (1986) EP 86101202 (1986)
<i>B. longum</i> No. 1022 (FERM-P 8033)	村尾周 久など	<i>B. lo ngum</i> ATCC 15708 の UV 突 然変異 株。	1. 耐酸性 pH4.7 で 7 日 間保存した結 果、原始菌株 の生残率は突 然変異株の 7 %。 2. 過酸化水素耐 性 50-500mm	明治乳 業	特開昭 61-185182 (1986)

[0007]

【表 4】

すでに特許を受けている菌株の特徴(4)

菌株	発明者	分離源	特徴	申請者	参考文献
<i>B. breve</i> M-7204 (FERM 1324)	川島拓司 など		1. 耐酸性 pH4.6 で 7 日 間保存した結 果、生残率は 0.02% (緩衝 液)。 pH4.8 で 7 日 間保存した結 果、生残率は 1.5% (牛乳)。	森永乳 業	特公昭 47-29995

[0008]

[表5]

文献に発表されている耐性菌株の特徴(1)

菌株	分離源	特徴	研究機関	参考文献
<i>B. longum</i> TQB 21-2-2	中年成人 の便	1. 酸素耐性 薄層に24時間静置 した結果、25%増 殖。容器を60時間 振とうした結果、 25%増殖。	天津軽工業 学院	許本発など (1994)
<i>B. bifidum</i> —	—	1. 酸素耐性 非嫌気状態で5～ 7時間培養した結 果、菌数は 10^8 cfu /ml に達した(牛 乳中)。 2. 耐酸性 pH4.5 で10日間保 存した結果、生残 率は13.5% (牛乳 中)。	武漢市轻工 業科学研究 所	傅曉超など (1990、19 92)
<i>B. bifidum</i> GSNE	乳児の 便	1. 酸素耐性 酸素6.2～6.4ppm で24時間培養した 結果、log 値が1. 3 増加。 酸素0ppmで24時間 培養した結果、 log 値が1.8 増加 (牛乳中)。	ヤクルト研 究所	馬田三夫 (1982)

文献に発表されている耐性菌株の特徴(2)

菌株	分離源	特徴	研究機関	参考文献
<i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i>	—	1. 胃酸耐性 pH 3、37℃/3hrに おいてそれぞれ log 値が5.3、2. 6 減少(0.2% NaCl, pepsin 0.32% 中)。 2. 胆汁耐性 胆汁塩135ppmの成 長率はそれぞれ67、 45% (培養基)。	ヤクルト研 究所	務台方彦 (1978)
<i>B. longum</i>	—	1. 胆汁塩耐性 2 % oxgall、37℃ /12hr において菌 数は、log 値が2. 01減少(蒸留水)。	ミシシッピ 一州立大学	Clark and Martin (1994)
<i>Bifido- bacterium</i> Bb-12	—	1. 胃酸耐性 pH 3 /2hrにおいて 菌は100 %生存し た(MRS 液体培養 基)。 2. 胆汁耐性 0.5% oxgall、37℃ /2hrにおいて菌は 100 %生存(酵母 抽出物を加えた牛 乳)。	Chr. Hansen's Lab.	Hoier (1992)

【0010】

【発明が解決しようとする課題】研究によれば、1 ビ
40 イドバクテリアム(*Bifidobacterium*) sp. ATCC 15700、
ATCC 15696、ATCC 15697及びATCC 15707は0.3 %胆汁酸
(glycocholate) 存在下において24時間培養したとこ
ろ、成長力は非常に低く、ほとんど成長していない。耐
酸性菌株も多くが菌体を酸性乳製品(pH 4~4.8)に
おいて冷蔵貯蔵した生残率に着目しており、胃酸耐性試
験を行っているものは少なく、そのpH設定も3~3.5
又は胃液分泌初期には発生する可能性がないpH 2前後と
している。

【0011】したがって、本発明の目的は、嬰兒便から

分離した1 ビフィドバクテリアムロンガム (*Bifidobact*
erium longum) 胃酸耐性菌株及び当該分離株を出発菌株
とし、突然変異菌種から胃酸、胆汁塩及び酸素に対する
耐性を持つビフィズス菌の多特性菌株を選別すること
である。さらにもう一つの目的は簡便な当該菌株の培養方
法を提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

(1) 微生物突然変異株の記載

本発明は健康な嬰兒の便から分離した耐酸性ビフィズ
菌菌株1 ビフィドバクテリアムロンガム (*Bifidobacter*
ium longum) Y 1 及びY 2 (ATCC 55813及び55814) 及

び当該菌株を原始菌株として突然変異の改良を行った後得た突然変異株ATCC 55815、55816、55817、55818に関するものである。突然変異種の前2者は原始菌株をATCC 55813としたもの、後2者は原始菌株をATCC 55814としたものである。本発明の菌株の特徴は胆汁塩酸などを含む胃腸環境耐性があり、且つ酸素耐性も高く、工業培養に有利である。

本発明の菌株の送付日と整理番号

微生物名称		送付日	整理番号
<i>Bifidobacterium longum</i>	Y1	1996年8月29日	ATCC 55813
<i>B. longum</i>	Y2	1996年8月29日	ATCC 55814
<i>B. longum</i>	Y1-2E-05	1996年8月29日	ATCC 55815
<i>B. longum</i>	Y1-4A-01	1996年8月29日	ATCC 55816
<i>B. longum</i>	Y2-1A-01	1996年8月29日	ATCC 55817
<i>B. longum</i>	Y2-2B-04	1996年8月29日	ATCC 55818

【0015】(2) 本発明の菌株の製造方法

本発明の新菌株の突然変異方法、選別分離の方針と手順及び培養基の組成などは、実施例において再度詳しく述べる。

(3) 菌株耐性の確認

①胆汁塩酸耐性

牛胆汁 (oxgall) は培養基においてヒト腸内菌を培養する時に一般的に使用されており、このためその効力はヒトの胆汁塩に類似しており、その平均濃度を0.3% (w/v) とする。このため本発明の菌株及び原始菌株は適当に活性化を行い、1%の接種量を取り、(1)基本培養基MRSに0.3%の牛胆汁を添加したもの一試験群、(2)基本培養基一対照群に接種し、24時間の培養を行ったあと、OD₆₀₀及び生菌数の測定比較を行い、胆汁塩酸耐性を確認する。

【0016】②耐酸性

胃酸pH値は胃内容物の進入時間及び種類により1.5～4.5の範囲で異なる。平均通過時間は2時間で、試験時はpH2を採用する。酸性の性質は塩酸に類似しているため、塩酸を生理食塩水で調整してpH2とし、37℃で2時間処理して生存菌数を測定し、さらにpH7の生理食塩水で処理した菌数と比較し、耐酸性を確認する。

【0017】③酸素耐性

変更した培養方式はすでに活性化した本発明の菌株を一般のスバイラル試験管に接種し、酸素の存在する条件下において静置培養したあと、24時間後にその成長をOD₆₀₀及び生菌数で測定し、嫌気的条件下(酸素の存在しない条件下)において培養したものと比較する。

【0018】④生残率の測定

測定するサンプル1mlを9mlの希釈液(0.1%蛋白ペプトン及び0.1%ゼラチンの水溶液)と混合し、適当

【0013】現在本発明菌株はすでにブタペストリーティ (Budapest Treaty) によりATCC (American Type Culture Collection) に送られており、その送付日と整理番号は表7に示す通りである。

【0014】

【表7】

20 な希釈濃度とする。1mlの希釈液を培養皿に取り、約20mlのMRS固体培養基(融解温度約45℃)を加え、振とうして均一化したあと、静置凝固させ、完全に凝固したあと、嫌気缶に倒置し、37℃で2～3日間培養し、取り出して生菌数を測定する。

【0019】⑤菌株の培養方法

本発明菌株の培養方法は脱脂乳において、酸素の存在する条件下において培養したところ、その他の成長促進剤を添加する必要がなく、産業としての生産に有利である。

30 ⑥菌株の応用

応用する場合、本発明菌株は単独で使用又はその他の乳酸菌(例えば1 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*)又は酵母菌(例えば1 *Candida kefyr*, *Saccharomyces florentinus*)及び使用可能な菌株とともに、2種又は2種以上でスターターとして、液体ヨーグルト、発酵乳、冷凍ヨーグルト、乳酸菌発酵飲料及び発酵豆乳などの製品を生産することができる。本発明菌株も食品添加物とすることができ、原料加工時に添加したり、発酵に参加せず発酵後期に添加したりできる。このため広く様々な製品、例えば牛乳、濃縮牛乳、粉ミルク、アイスクリーム、ヨーグルト、チーズ、リンゴジュース、豆乳、ケーキ、キャンディー、ベビーフード、食事療法製品、乳酸菌発酵飲料及び上記の発酵製品に応用できる。各種製品の添加量は1g当たり、又は1ml当たり菌量10⁴～10⁸ cfuとする。

【0020】このほか、もう一つの応用方法は本発明菌株自身又はこの菌株を含む上記製品の一つで冷凍又は噴霧乾燥粉末を生成することで、1g当たりに10⁸個以上の活性ビフィズス菌を含むものとする。この種の製品に

酵母粉、炭水化物又はその他の充填成分を加えて、錠剤又はカプセルを製造し、ビフィズス菌を含む消化整腸剤又はインスタント食品、又は食用できる菌体粉末とすることができる。

【0021】

【発明の実施の形態】

【実施例1】

菌種の培養及び保存

ビフィズス菌分離株 1 *Bifidobacterium longum* ATCC 5

5813及びATCC 55814又は突然変異株をMRS培養基にて 10

プロテオゼ・ペプトン (Proteose peptone No.3)

牛肉抽出物

酵母抽出物

ブドウ糖

Tween 80

クエン酸アンモニウム

酢酸ナトリウム

硫酸マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

硫酸マンガン ($MnSO_4 \cdot H_2O$)

磷酸水素カリウム (K_2HPO_4)

蒸留水

10.0 g

10.0 g

5.0 g

20.0 g

1.0 g

2.0 g

5.0 g

0.1 g

0.05 g

2.0 g

1.0 l

pHを6.2～6.5に調整する。

【実施例2】

菌種の分離選別

健康な嬰兒の便を取り、BL-LPIM (BL agar に lithium chloride 2g/l, metronidazole 2mg/l, sodium iodoacetate 0.025g/l, sodium propionate 3g/l を添加)、及びBIM (Reinforced Clostridial Agar に nalidixic acid 0.02g/l, polymyxin B sulfate 0.0085g/l, kanamycin sulfate 0.05g/l, sodium iodoacetate 0.025g/l, 2,3,5-tri-phenyltetrazolium chloride 0.025g/l を添加) の選別培養基において、194株の *Bifidobacterium* spp. を分離し、再度耐酸性、胆汁塩耐性、酸素耐性試験を行った後、2株の耐酸性株ATCC 55813及びATCC 55814を分離した。バーゲイのマニュアル (Bergey's Manual) が推薦する方法で、2株は1ビフィドバクテリウムアロングム (*Bifidobacterium longum*) であることを鑑定した。その菌特性は以下の通りである。

(1) 形態学的特徴

グラム陽性菌で、顕微鏡検査では棒形桿状、Y字型、アーチ型、V字型を呈し、ときには膨大現象又はノード (node) 形成が見られる。MRS固体培養基の表面におけるコロニー形状は円凸状、滑らかで、白色を呈し、約1～4mm前後である。培養基の内部におけるコロニーは円状、ディスク状、又は星状三角形を呈し、底部のコロニーは白色で、周辺部は鋸状のハロゾーン (halo zone) 代謝物で3～8mm前後である。

(2) 培養形状の特徴

成長温度は25～42℃で、最適温度は37～42℃で 50

培養する。液体培養を行う場合、嫌気型ゴム栓を持つ試験管を容器 (Bellco Glass Inc.) を使用し、Virginia Polytechnic Institute (V. P. I.) の嫌気操作システムで菌株の接種を行い、90%の窒素と10%の二酸化炭素の混合気体を使用する。固体培養する場合は、菌株を固体培養基に接種した後、嫌気缶に倒置し培養する。その保存方法は、菌体を10%のグリセロールを含むMRS液体培養基において-80℃冷凍保存を行うか、又は20%の脱脂乳において冷凍乾燥した後4℃で保存する。

【0022】MRSの成分は以下に示す通りである。

ある。

【0023】成長pHは5～9、最適pHは6.5～7.5である。MRS液体培養基において嫌気的条件下の培養を24時間行ったところ、生成した酢酸/乳酸比は約1.5である。

(3) 生理性質

カタラーゼ活性 (-)、気体生成試験 (-)、乳凝固活性 (+)、ゼラチン水分解性 (-)、硝酸塩還元活性 (-)、インドール生成試験 (-)、硫化水素生成試験 (-) である。

(4) 炭素源の利用性

発酵がプラス反応であったものは、キシロース (xylose)、メリビオース (melibiose)、ガラクトース (galactose)、グルコース (glucose)、アラビノース (arabinose)、ラクトース (lactose)、フルクトース (fructose)、ラフィノース (raffinose)、マルトース (maltose)、リボース (ribose)、スクロース (sucrose)、マンノース (mannose)、メリジトース (melizitol) である。マイナス反応であったものは、マンニトール (mannitol)、ソルビトール (sorbitol)、セロビオース (cellobiose)、トレハロース (trehalose)、イヌリン (inulin)、グリコーゲン (glycogen)、でんぷん (starch)、サリシン (salicin)、アミグダリン (amygdalin)、ラムノース (rhamnose)、メソエリトリトール (meso-erythritol)、グリセロール (glycerol)、メソイノシトール (meso-inositol)、グルクロン酸 (glucuronic acid) である。

【実施例3】

菌種の改良

(1) UV突然変異

ATCC 55813及びATCC 55814をMRS培養基において37℃で2回活性化した後、2% (v/v) 菌液を10ml MRS培養液に取り、18～24時間培養し、菌体を集めて0.1 M硫酸マグネシウム溶液で3回洗浄した後、同じ溶液に懸濁させる。菌液を無菌シャーレに取り、UV StratalinkerTM 1800 (Stratagene)に置き、250erg UV剂量を照射する。菌液を再度MRS培養基に移して一晩培養し、これが突然変異菌体となる。0.2ml菌液を選別培養基に塗布し、37℃で3～4日間培養する。

(2) NTG突然変異

ATCC 55813及びATCC 55814をMRS培養基において前述の操作方法で菌体を集めた後、0.1 Mの燐酸緩衝液 (pH 7.0) で菌体を2回洗浄し、再度突然変異剤ニトロソグアニジン (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)、NTG 200μg/mlを使用し37℃で30分間作用させる。遠心分離し、上記緩衝液で2回洗浄した後、残ったNTGを除去し、菌体をMRS培養基に懸濁させ、一分離株及び変異株の耐性

晩培養し、これが突然変異菌体となる。0.2ml突然変異菌液を選別培養基に塗布し、37℃で3～4日間培養する。

(3) 選別培養基

①耐酸性株選別培養基：MRS固体培養基を4 M HClでpH4～5に調整。

【0024】②胆汁塩耐性選別培養基：MRS固体培養基に0.3% (w/v) の牛胆汁を添加。選別された耐性を持つ可能性のある菌株を前述の確認方法で確認し、さらに突然変異で多耐性菌株を得た。結果を表8に示す。変異株は胆汁塩存在下において24時間保存したところ、 $10^5 \sim 10^6$ 個/mlに増えており、野生株に比べて成長が $10^6 \sim 10^8$ 倍速い。耐酸性は維持され、野生株と同程度であった。酸処理後に菌数はlog 値が4前後減少している。さらに、非嫌気的条件下の培養における成長は良好である。

【0025】

【表8】

菌株 <i>B. longum</i>	胆汁塩耐性 OD _{600nm}		耐酸性 菌数減少のlog値 ^c	酸素耐性 OD _{600nm}	
	対照群 ^a	試験群 ^b		嫌気	非嫌気 ^d
ATCC 55813	2.3668	0.1000	-3.93	2.3668	2.3560
ATCC 55814	2.6511	0.1600	-3.56	2.6511	1.5020
ATCC 55815	2.3634	1.5800	-3.96	2.3634	2.0490
ATCC 55816	2.0054	1.4807	-3.66	2.0054	1.4834
ATCC 55817	2.6920	1.6740	-3.68	2.6920	2.2320
ATCC 55818	2.3832	1.2652	-4.27	2.3832	1.4629

注：a：菌株培養はMRS broth/24時間で培養する。

b：菌株培養はMRS broth+0.3% oxgall/24 時間で培養する。

c：(pH2.0塩酸/塩化ナトリウム水溶液処理後2時間後の菌数log 値) から (pH7.0 生理食塩水処理後2時間後の菌数log 値) を引いた値。

d：菌体を非嫌気状況のスパイラル管においてMRS broth/24 時間で培養する (OD_{600nm} ≈ 0.2 から始める)。

【0026】〔実施例4〕

培養のスケールアップ 1

ビフィドバクテリウムロンガム (*Bifidobacterium longum*) 変異株 ATCC 55815 等を10mlのMRS液体培養基で培養し、37℃で18～24時間静置した。1%の接種量を300ml MRS液体培養基が入っている500ml 三角フラスコに入れ、同様条件で18～24時間培養した後菌株の耐性を測定する。耐性能力は表8に示す通り、少量培養に比べてと同等又はやや優っていた。

〔実施例5〕

本発明の菌株の特徴

本発明の株と同種標準株 *B. longum* ATCC 15707、*B. bifidum* ATCC 29521、*B. breve* ATCC 15700、及び *B. breve* ATCC 15701などについて、胆汁塩及び酸耐性に関する比較試験を行ったところ、結果は表9に示す通り本発明の菌株は高い胆汁塩及び酸耐性を示した。

【0027】

【表9】

本発明の菌株と標準菌株の耐性比較

菌株	胆汁塩耐性				耐酸性
		菌数 (log 値)			
		対照群 ^a	試験群 ^b		
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521	8.62	< 3.00	-5.50	
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	8.22	< 3.00	-5.59	
<i>B. breve</i>	ATCC 15700	8.88	4.04	-7.33	
<i>B. breve</i>	ATCC 15701	8.91	4.94	-8.30	
<i>B. longum</i>	ATCC 55815	9.53	8.91	-4.32	
<i>B. longum</i>	ATCC 55816	9.26	8.85	-4.06	
<i>B. longum</i>	ATCC 55817	9.36	8.73	-3.87	
<i>B. longum</i>	ATCC 55818	9.16	8.98	-4.43	

注 ; a: 菌株培養は M R S broth/24 時間で培養する。

b: 菌株培養は M R S broth+0.3% oxgall/24時間で培養する (log 値が大きいほど胆汁塩耐性が高い)。

c: (pH2.0塩酸/塩化ナトリウム水溶液処理後2時間後の菌数log 値) から (pH7.0生理食塩水処理後2時間後の菌数log 値) を引いた値 (マイナス値が小さいほど耐酸性が高い)。

【0028】〔実施例6〕

菌株の培養

250ml三角フラスコに125mlの12%還元脱脂乳を入れ、115℃で20分間殺菌した後、2% (v/v)の本発明の株と標準株をそれぞれ接種する。37℃、酸素の存在する条件下において静置培養し、経時的にサンプリングして成長菌数とpH値を測定する。結果は表10に示

す通り。本発明の菌株1*B. longum* ATCC 55816は還元脱脂乳において、成長促進剤を加える必要がなく、22時間の好気培養後 1.14×10^8 cfu/mlに成長し、且つ成長力を維持し、生存力は68時間後でも 3.49×10^8 cfu/mlを有した。

【0029】

【表10】

好氣的（酸素の存在する）条件下における標準株と変異株の成長

菌株	培養時間							
	0hr		22hr		44hr		68hr	
	pH	菌数 cfu/ml	pH	菌数 cfu/ml	pH	菌数 cfu/ml	pH	菌数 cfu/ml
<i>B. bifidum</i>								
ATCC 29521	6.29	8.30×10^6	6.01	3.26×10^7	6.02	$< 10^3$	6.02	$< 10^3$
<i>B. longum</i>								
ATCC 15707	6.13	3.30×10^7	5.86	$< 10^5$	5.83	$< 10^5$	5.82	$< 10^5$
<i>B. breve</i>								
ATCC 15700	6.17	1.50×10^7	6.02	3.11×10^6	5.05	3.85×10^7	4.88	1.60×10^7
<i>B. breve</i>								
CC 15701	6.23	1.64×10^7	5.65	5.20×10^8	5.52	$< 10^5$	5.50	$< 10^5$
<i>B. longum</i>								
ATCC 55813	6.14	3.00×10^7	6.03	$< 10^4$	6.02	$< 10^4$	6.01	--
<i>B. longum</i>								
ATCC 55814	6.12	1.62×10^7	5.95	$< 10^5$	5.91	$< 10^5$	5.90	--
<i>B. longum</i>								
ATCC 55815	6.15	5.44×10^7	5.86	6.05×10^7	5.72	$< 10^5$	5.73	--
<i>B. longum</i>								
ATCC 55816	6.23	2.70×10^7	5.16	1.14×10^9	3.31	2.89×10^9	3.21	3.49×10^8
<i>B. longum</i>								
ATCC 55817	6.16	2.22×10^7	5.73	2.50×10^6	5.71	$< 10^5$	5.70	--
<i>B. longum</i>								
ATCC 55818	6.14	2.86×10^7	5.98	3.58×10^6	5.96	$< 10^4$	5.96	--

【 0 0 3 0 】

【発明の効果】本発明によって分離した胃酸耐性菌株は胃液に対して耐性があり、生存力が高い。突然変異の新菌株は胆汁塩耐性、胃酸耐性及び酸素耐性を持つビフィズス菌変異株であり、当該菌株の酸素耐性は培養方法を簡素化することができ、嫌気装置と操作方法を使用する必要がなく、培養時の窒素充填の必要がなくなるため、産業応用においてコストの削減、製造工程の簡素化、貯

蔵生存力の向上などを提供することができる。さらに、菌株の胃酸、胆汁塩耐性で食用後容易に腸内へ到達することができ、製品の性能を高めることができる。

【 0 0 3 1 】さらに、本発明の胃腸環境（酸、胆汁）及び酸素に対する耐性をもつビフィズス菌変異株及び発酵成長の方法については、上述した発明の手順及び内容以外の方法で行うことも可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

A23L 2/52

// (C12N 1/20

C12R 1:01)

識別記号

庁内整理番号

F I

A23L 2/00

技術表示箇所

F